# LUGARES DE UNION DE BAJA AFINIDAD PARA GLUCOCORTICOIDES: UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA REGULACION MULTIHORMONAL DE PROTEINAS MICROSOMALES HEPATICAS


Discurso de ingreso en la Academia del

DR. BONIFACIO NICOLAS DIAZ CHICO


## RESUMEN


Muchas proteínas hepáticas están sometidas a control multihormonal. Esto crea grandes dificultades a la hora de comprender la importancia relativa de cada hormona -y de cada mediador intracelular de su acción- en la activación de los genes que codifican estas proteínas. En los últimos años, nuestro laboratorio ha estudiado una proteína microsomal hepática capaz de unirse a varias hormonas esteroideas con una afinidad inferior a la de los receptores clásicos, y que hemos denominado **LAGS** (de Low Affinity Glucocorticoid-binding Sites). Los LAGS están regulados por un sistema multihormonal complejo. En primer lugar, los LAGS son específicos del sexo masculino y tienen una ontogenia realmente peculiar. Además desaparecen tras la hipofisectomía y casi desaparecen durante el hipotiroidismo. Disminuyen su concentración tras adrenalectomía, y la orquidectomía, practicada antes de la pubertad, hace que su concentración aumente. Estudios sobre cada hormona individual permiten concluir que existe una regulación sinérgica de los LAGS por glucocorticoides, hormona de crecimiento y hormonas tiroideas. Por tanto, los LAGS proporcionan un modelo reproducible y relativamente sencillo para el estudio de la regulación multihormonal de proteínas microsomales hepáticas.


## SUMMARY


Many liver proteins are under endocrine regulation by various hormones. We have extensively studied the binding properties and the endocrine regulation of the liver microsomal Low-Affinity Glucocortioid-binding Sites (LAGS). These proteins bind glucocorticoids such as cortisol, corticosterone and dexamethasone, but not triamcinolone acetonide. The LAGS are male specific, and undergo a peculiar ontogeny. They dissapear after hypophysectomy, and adrenalectomy (ADX) and hypothyroidism (TX) provoke an important decrease in their concentratration. Orchiectomy performed before the puberty causes an increase in the LAGS concentration, that is abolished by testosterone propionate treatment. Both thyroid Hormones ($T_3/T_4$) and Growth Hormone (GH) are able to induce the LAGS. Glucocorticoids are ineffective when injected alone, but potentiate the effects of both GH and thyroid hormones. We conclude that glucocorticoids, GH and thyroid hormones act synergistically on the LAGS regulation.


---


Texto del discurso pronunciado por el Dr. D. Bonifacio Nicolás Díaz Chico en Las Palmas de Gran Canaria (30-6-93)

# 1. INTRODUCCION

La regulación hormonal de proteínas hepáticas está sujeta a múltiples controversias, principalmente porque muchas de ellas son controladas por varias hormonas. Entre las proteínas hepáticas mejor conocidas que se encuentran sometidas al control de varias hormonas simultáneamente se encuenta la proteína de secreción $\alpha_{2u}$-globulina [1], y la proteína intracelular conocida como receptor de estrógenos (RE) [2,3]. Por otra parte, no se han desarrollado modelos sencillos para abordar con eficacia los sistemas de regulación multihormonal de proteínas hepáticas.

El hígado contiene una gran variedad de proteínas microsomales, entre ellas los enzimas de la familia de los p450, que participan en los procesos de oxidativos que sufren las hormonas esteroideas, medicamentos y productos tóxicos a su paso por el hígado. Poco se sabe sobre la regulación de los genes que codifican para estas proteínas microsomales, salvo que algunos de ellos están sometidas a control multihormonal, y que parte de ellos sólo se expresan en uno de los dos sexos [4,5].

En los últimos 5 años, nuestro laboratorio ha estudiado una proteína microsomal hepática, presente en las ratas macho, que hemos denominado LAGS (de Low Affinity Glucocorticoid-binding Sites). Los LAGS presentan un interesante perfil farmacológico de capacidad de unión a diversas hormonas esteroideas [5-11], y se encuentran regulados al menos por tres hormonas [12-14].

Debido a que los LAGS son abundantes y fáciles de medir, además de experimentar cambios de concentración muy amplios debido a manipulaciones hormonales diversas, consideramos que pueden cosntituir un buen modelo para estudiar la regulación multihormonal de proteínas microsomales hepáticas.

# 2. METODOLOGIA GENERAL PARA LA DETERMINACION DE LAGS

## 2.1 Animales

Ratas macho intactas e hipofisectomizadas (HYPOX) de la cepa Sprague-Dawley, y ratas macho de la cepa Lewis fueron adquiridos en la empresa Mollegaard (Dinamarca). Ratas enanas derivadas de la cepa Lewis fueron adquiridas al National Institute for Medical Research (Mill Hill, London, U.K.). Las ratas fueron hechas hipotiroideas mediante la administración de Propiltiouracilo al 0.05% en el agua de bebida, y dejándolos en ese tratamiento al menos 21 dias.

## 2.2 Preparacion de membranas microsomales

Todos los pasos que se mencionan a continuación fueron llevados a cabo a 0-4°C. Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en un homogenizador Potter de teflón-cristal (B.Braun, Melsungen, Alemania) en tampón TMMDS (50 mM Tris-HCl, 10 mM molibdato sódico, 5 mM cloruro magnésico, 2 mM ditiotreitol, y 0.25 M de sacarosa, pH 7.5). Los homogenados fueron centrifugados a 17,000 x g for 15 min para separar las fracciones nuclear y mitocondrial. El sobrenadante fué centrifugado de nuevo a 105.000 x g para obtener el citosol, que a veces se usó para medir la concentración de receptores de glucocorticoides. El precipitado de 105.000 x g fue resuspendido en TMMDS y usado como suspensión microsomal (2-3 mg proteína/ml) para ensayos de captación hormonal. Las proteínas fueron medidas según descripción de Lowry *et.al.* [15], usando seroalbúmina bovina como estándar.

## 2.3 Análisis de captación de [$^3$H]Dexametasona por LAGS

Los LAGS fueron medidos mediante incubación de alícuotas de suspensión microsomal con 10 nM a 500 nM de [$^3$H]dexametasona ([$^3$H]DEX, concentración final), con o sin un exceso de 200 veces de DEX no radiactiva. La incubación se prolongaba al menos 18 horas a 0-4 °C. Luego se añadía una suspensión de dextrano-carbón activo (DCC), se agitaban las muestras, se incubaban por 10 min y se centrifugaban. La radiactividad era medida en el sobrenadante mezclando una alícuota con líquido de centelleo. El contaje de radiactividad se convertía en pmol [$^3$H]DEX/mg proteína microsomal. Cuando los resultados se representaban en función de la concentración de [$^3$H]DEX inicial se obtiene una curva de saturación típica (Fig. 1A).

El programa de ajuste de curvas LIGAND-PC [16] fué utilizado para determinar los tipos de constantes de disociación ($K_d$) el número máximo de lugares de unión [$^3$H]DEX-LAGS ($B_{max}$). La recta obtenida de la representación de la ecuación de Scatchard (Fig.1B) indica que los LAGS constituyen una población homogénea de lugares de unión microsomales para [$^3$H]DEX.

## 3. PERFIL DE CAPTACION DE ESTEROIDES POR LOS LAGS

Varias hormonas esteroideas son capaces de competir con la [$^3$H]DEX por unirse a los LAGS. Este es el caso de corticosterona, cortisol, prednisolona y otros glucocorticoides. La progesterona, y en menor extensión el progestágeno sintético promegestone (R5020) también compiten con [$^3$H]DEX por unirse a los LAGS. Es interesante que la triamcinolona acetónido, el mejor ligando para receptores de glucocorticoides, no se una a los LAGS (Tabla 1). Los LAGS también captan algunos andrógenos sintéticos (estanozolol y danazol) y estrógenos sintéticos (etinil-estradiol y mestranol), pero no las hormonas naturales respectivas [6.12.13]. La capacidad de los LAGS de unirse a DEX pero no a triamcinolona acetónido les hace diferentes de otras proteínas hepáticas solubles [10,17], como el propio GR.

A pesar de que la capacidad de los microsomas hepáticos de unirse a los esteroides es conocida desde hace más de 20 años, poco es lo que se sabe respecto a su posible función intracelular. Como hipótesis de trabajo, otros autores han avanzado dos posibilidades: 1) podría tratarse de un transportador membranal de hormonas esteroides; o, 2) podría ser un enzima capaz de modificar la actividad hormonal, que actuara modulando su actividad o como una barrera para su acción. En este caso podría tratarse de un enzima metabolizador de esteroides.

Es importante constatar que las propiedades de los LAGS en cuanto a captadores de hormonas esteroideas hace que puedan estar semisaturados a las concentraciones de progesterona que se encuentran el plasma durante el embarazo, o de cortisol durante situaciones de estrés. Recientemente hemos podido demostrar que existen proteínas microsomales capaces de captar estanozolol o etinil estradiol en tejidos humanos, y, en

particular en el cáncer de mama, lo que abre interesantes perspectivas sobre la comprensión de sus funciones [6].

## 4. ONTOGENIA DE LOS LAGS

El primer aspecto importante respecto a una posible regulación hormonal de los LAGS es su especificidad de género, pues sólo están presentes en ratas macho. En efecto, las ratas hembras de la cepa Lewis no expresan LAGS en ningún momento de su vida.

Los LAGS tienen una interesante ontogenia [13,18], siendo indetectables hasta la 4ª semana de vida, aumentando abruptamente durante la pubertad, para alcanzar el máximo nivel hacia los 3 meses y decreciendo paulatinamente a lo largo de la vida adulta (Fig.2). La ontogenia de los LAGS contrasta con la del RG, que están presentes desde la vida intrauterina con una concentración bastante estable a lo largo de la vida ( 0.2 a 0.3 pmol/mg proteína).

Recientemente hemos obtenido evidencia de que el aumento con la edad en la concentración de LAGS coincide con un aumento en el umbral de respuesta a los glucocorticoides, en términos de síntesis del enzima tirosín-amino-transferasa (TAT). Este hecho es compatible con la hipótesis de que los LAGS puedan constituir alguna clase de barrera intracelular en el mecanismo de acción intracelualer de los glucocorticoides en el hígado [19,20].

## 5. EFECTO DE LA ORQIDECTOMIA SOBRE LOS LAGS

Dado que los LAGS aumentan bruscamente durante la pubertad [12], y que son específicos del sexo masculino, intentamos encontrar si los andrógenos están involucrados en la regulación de su ontogénesis, tal como ocurre en otras proteínas hepáticas como la $\alpha_{2u}$-globulina [21].

Las ratas macho fueron orquidectomizadas o seudooperadas cuando tenían 25 dias de edad. Inmediatamente recibieron el implante de una cápsula de silastic conteniendo testosterona disuelta en aceite, o aceite sólo, como control. Los resultados (Fig. 3) muestran que la orquidectomía elevó los niveles de LAGS significativamente respecto de las pseudooperadas,

y que el implante con testosterona rebajaba los niveles de LAGS a su situación normal. Estos datos prueban que la testosterona juega un papel negativo en la regulación de los LAGS, si bien su papel es moderado en comparación con otras hormonas. El efecto de la testosterona sobre los LAGS es exactamente opuesto al que juega en el caso de la $\alpha_{2u}$-globulina [21].

## 6. EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS LAGS

Dado que los LAGS captan glucocorticoides, tratamos de encontrar si la adrenalectomía afecta la concentración de LAGS. Para ello, ratas macho de tres meses de edad fueron sometidas a adrenalectomía o seudoperadas, y al cabo de tres dias inyectadas con el 1 mg/día de acetato de corticosterona disuelto en aceite, o con aceite sólo como control. Los resultados (Fig. 4) muestran que la adrenalectomía rebaja los niveles de LAGS al 50% del control, y que el tratamiento con acetato de corticosterona restaura los niveles normales de LAGS. Estos datos permiten concluir que los glucocorticoides son las hormonas adrenales implicadas en la regulación de los LAGS, y que juegan un papel positivo en su regulación.

## 7. EFECTO DE LA HIPOFISECTOMIA SOBRE LOS LAGS

Dado que tanto las homonas testiculares como las adrenales están reguladas por la adenohipófisis, no propusimos explorar a continuación el efecto de la hipofisectomía sobre los LAGS. Para ello utilizamos ratas macho de tres meses, que habían sido hipofisectomizadas una semana antes. Los resultados (Fig. 5) muestran que la hipofisectomía disminuye drásticamente los niveles de LAGS, hasta hacerlos prácticamente indetectables. Por lo tanto, bien las hormonas hipofisarias directamente, o bien las hormonas controladas desde la hipófisis indirectamente, son absolutamente necesarias para la iniciación y mantenimiento de la expresión de los LAGS.

Este resultado claramente contrasta con el incremento de receptores de glucocorticoides medido en las mismas muestras de hígado, que es debido a la acumulación de receptores por falta de utilización de los mismos a causa de la disminución de secreción de glucocorticoides por las adrenales de los animales hipofisectomizados.

Por otra parte, y dado que el efecto de la hipofisectomía sobre los LAGS es mucho más fuerte que la debida a la adrenalectomía, es preciso concluir que existen otras hormonas relacionadas con la hipófisis, además de los glucocorticoides, implicadas en la regulación de los LAGS.

En un intento de clarificar este extremo se inyectaron diversas hormonas hipofisarias a las ratas hipofisectomizadas. La Fig. 6 muestra que el tratamiento sustitutivo de la hipofisectomía con diversas hormonas hipofisarias fué bastante inefectivo, salvo en el caso de la hormona de crecimiento humana (hGH) que fué capaz de una restauración parcial del nivel de LAGS. Es interesante destacar que el efecto de la hGH fue más pronunciado cuando se inyectó tres veces al dia que cuando se la suminitró de forma continuada mediante una bomba osmótica (resultados no incluidos). Este dato es interpretable en el sentido de qiue la imitación de los picos de secreción fisiológicos de GH en el macho mediante tres inyecciones al día de hGH [22,23] puede tener relevancia para obtener un respuesta mejor de inducción de LAGS.

## 8. TRATAMIENTO CON hGH A RATAS ENANAS

Las ratas hipofisectomizadas tienen todo el sistema endocrino dramáticamente alterado. Por ello, el efecto de la hGH encontrado en las ratas hipofisectomizadas debía ser comprobado en otros modelos animales. Así, se adquirieron ratas macho enanas, derivadas de la cepa Lewis, que son específicamente deficientes en GH. En el resto de los parámetros endocrinos estas ratas se encuentran dentro del rango de la normalidad [24].

Las ratas enanas tienen una concentración de LAGS que representa el 33% de las ratas normales de la misma edad. Cuando se administró hGH a las ratas enanas se obtuvo una perfecta curva dosis-respuesta (Fig.7), sin llegar a alcanzar el nivel de LAGS de las ratas normales, debido seguramente a las dosis usadas y el modo de administrarla. Estos resultados permiten asignar a la GH un papel estimulante de la producción de LAGS, que es cuantitativamente relevante.

## 9. EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO

Ninguno de los tratamientos vistos hasta ahora permiten asegurar que determinada hormona mantiene bajo control a los LAGS completamente. En la siguiente etapa tratamos de demostrar si las hormonas tiroideas, también dependientes de la hipófisis, juegan algún papel en la regulación de los LAGS.

Con este propósito producimos ratas hipotiroideas por el procedimiento de administrar PTU (Propiltiouracilo) en el agua de bebida [25]. La Fig. 8(A) muestra que trás 21 dias de tratamiento se consigue un efecto casi tan pronuniado como en el caso de la hipofisectomía. Cuando el tratamiento con PTU es suprimido, los LAGS retornan al nivel normal en dos semanas. El tratamiento con $T_3$ a ratas todavía bajo el efecto del PTU hace reversible el efecto del hipotiroidismo, aumentando los LAGS al nivel normal (Fig. 8(B)). Estos datos prueban que las hormonas tiroideas tienen un papel determinante en la regulación de la expresión de LAGS en la rata macho.

## 10. EFECTOS COMBINADOS DE GLUCOCORTICOIDES Y $T_3$

Desde hace algunos años se sabe que la síntesis y secereción de GH en la rata es dependiente de las hormonas tiroideas, y, en menor medida, de los glucocorticoides [26,28]. Por lo tanto, el potente efecto descrito del hipotiroidismo sobre el nivel de LAGS pudo ser debido a un efecto indirecto de la falta de hormonas tiroideas sobre la secreción de GH. Para descartar esa posibilidad utilizamos ratas hipofisectomizadas, en las que sí es posible demostrar la existencia de acciones directas de las hormonas tiroideas y de los glucocortcoides sobre los niveles de LAGS. La Fig. 9 muestra que tanto la corticosterona como la $T_3$ son poco efectivas al inyectarlas por separado en ratas hipofisectomizadas. Sin embargo, cuando fueron inyectadas conjuntamente su efecto fué realmente importante.

Estos resultados demuestran que el efecto de las hormonas tiroideas sobre el hígado es directo y no necesariamente mediatizado por la GH. También ilustran que glucocorticoides y hormonas tiroideas actúan sinérgicamente sobre el hígado para alcanzar una inducción óptima de los LAGS.

## 11. EFECTOS COMBINADOS DE GLUCOCORTICOIDES, $T_3$ Y GH

A continuación tratamos de comprender qué clase de interrelaciones se establecen entre GH, hormonas tiroideas y glucocorticoides sobre la regulación de los LAGS. El único modelo posible para estudiar estas interrelaciones es la rata hipofisectomizada. En estas ratas encontramos, en primer lugar, que los glucocorticoides potencian el efecto de la GH, de manera análoga a lo que hacen con la $T_3$ (Fig.10). Este hecho clarifica el efecto permisivo de los glucocorticoides sobre los LAGS: son poco efectivos actuando por si solos, pero tienen un efecto sinérgico importante al actuar bien con la GH bien con la $T_3$.

El paso siguiente fué estudiar las interrelaciones de las tres hormonas actuando simultáneamente. Sorprendentemente, la $T_3$ y la GH parecían antagonizarse una a la otra, tanto en presencia de glucocorticoides como en su ausencia (Fig.10).

Pensando en la posibilidad de que el aparente efecto antagónico de la $T_3$ y la GH pudiera ser debido a las altas dosis de $T_3$ usadas, diseñamos un experimento para explorar un amplo rango de dosis de la hormona tiroidea. Partimos de 50 ratas hipofisectomizadas, todas ellas tratadas con glucocorticoides a lo largo del experimento. Este grupo se dividió en dos mitades: a 25 ratas se les inyectó 100 $\mu$g hGH/dia (Grupo GH+), divididas en tres inyecciones diarias y las otras 25 ratas recibieron suero salino con la misma regularidad (Grupo GH-). De cada uno de los grupos GH+ y GH- se tomaron subgrupos de 5 ratas, que recibieron el tratamiento de $T_3$ siguiendo un patrón de dosis-respuesta de 0, 0.1, 0.5,1, y 2.5 $\mu$g $T_3$/100g de peso, administradas con la primera dosis del día de GH.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 11. En ausencia de GH (grupo GH-), el efecto inductor de la $T_3$ no fué evidente hasta que se alcanzaron los 0.5 $\mu$g/100 g de peso, a partir del cual su efecto es muy potente. En presencia de GH (grupo GH+) dosis de $T_3$ tan bajas como 0.1 $\mu$g/100 g son capaces de producir inducción máxima de LAGS. Dosis superiores a ésta realmente causan inhibición de la síntesis de LAGS. Este experimento dejó claro que las tres hormonas actúan sinérgicamente en presencia de bajas dosis de $T_3$, pero sus efectos se interfieren a dosis más altas. El estudio de los mecanismos moleculares que participan en una regulación de esa complejidad promete aportar información de una gran una caliadad para la comprensión de mecanismos de regulación hormonal de proteínas hepáticas.

Puesto que la $T_3$ tiene una vida media corta y es dificil establecer cuando se está inyectando en dosis fisiológicas, se repitió el experimento inyectando $T_4$, cuya vida media es más larga y permite establecer niveles fisólógicos de hormonas tiroideas [29]. Los resultados mostraron que la inducción máxima de LAGS se consigue con una dosis de $T_4$ de 1.5 $\mu$g/100 g de peso, la cual está considerada como fisiológica. Este experimento permite asegurar que las hormonas tiroideas, la GH y los glucocorticoides actúan sinérgicamente a niveles fisiológicos en la regulación de la concentración de LAGS.

## 12. AUSENCIA DE EFECTO DE LA DIABETES SOBRE LOS LAGS

Algunas proteínas hepáticas como la $\alpha_{2u}$-globulina y el IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) son inducidos por la insulina [30]. A su vez, la mayoría de las acciones de la GH son mediatizadas por el IGF-1. En un intento de dilucidar si el IGF-1 está involucrado en la regulación de los LAGS, estudiamos el efecto del ayuno y la diabetes sobre los LAGS, puesto que la insulina es necesaria para la producción hepática de IGF-1 y el ayuno causa una importante caida en los niveles de IGF-1 [31].

La diabetes estudiada fué la inducida por estreptozotocina. En estas ratas se encontró que ni la diabetes inducida, tanto si estaba tratada con insulina como si no lo estaba, ni tampoco el ayuno tenían efecto alguno sobre los niveles de LAGS.

Este experimento demuestra que los LAGS no están regulados por la insulina y también que su concentración no es influida por la ingesta de alimento. No obstante, ni este experimento ni los restantes descritos hasta ahora excluyen la posibilidad de que los factores paracrinos como el propio IGF-1 u otros, que se encuentran bajo regulación hormonal y son producidos por el propio hepatocito, participen de modo directo en la regulación de los LAGS.

## 13. REGULACION MULTIHORMONAL DE RE, $\alpha_{2U}$-GLOBULINA Y LAGS

Los hechos conocidos sobre la regulación endocrina de las tres proteínas hepáticas mejor estudiadas desde este punto de vista -el receptor de estrógenos (RE), la $\alpha_{2u}$-globulina y los LAGS- se encuentran resumidos en la Tabla 2 [2,3,30]. Cada una de estas proteínas tiene sus propias peculiaridades en términos de regulación hormonal, y los LAGS difieren bastante de ambas, en particular en lo que se refiere a la participación de la insulina y las hormonas sexuales.

La Fig. 12 resume todo el conocimiento actual sobre la regulación endocrina de los LAGS. Estos hechos permiten concluir que los LAGS están regulados sinérgicamente por las hormonas tiroideas, la GH y los glucocorticoides a niveles fisiológicos, con una influencia negativa, aún sin evaluar, de la testosterona. El papel de todas estas hormonas sobre la ontogenia de los LAGS, y las razones de tipo ontológico o endocrino acerca de su falta de expresión en la rata Lewis hembra son cuestiones todavía abiertas.

El hígado contiene numerosas proteínas miscrosomales, entre ellas la familia de los enzimas P450, que juegan papeles fundamentales en el metabolismo de diversas sustancias naturales, como las hormonas esteroideas, o xenobióticas, como fármacos y sustancias tóxicas [32,33]. Recientemente hemos podido demostrar que proteínas microsomales capaces de captar hormonas esteroideas -LAGS o proteínas capaces de interactuar con los LAGS- existen en numerosos tejidos animales y humanos, notablemente en el cáncer de mama [6 y resultados no publicados]. Los LAGS son actualmente la proteína microsomal cuya regulación endocrina ha sido más extensamente estudiada. Es probable que las peculiaridades de la regulación hormonal de los LAGS aquí descritas abran el camino para la comprensión de la regulación de las otras proteínas microsomales captadoras de hormonas esteroideas, cuyas funciones podrian verse alteradas bajo situaciones naturales o artificiales de modificación de los parámetros hormonales que las regulan.

## AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones reumidas en este trabajo han sido realizadas a lo largo de cuatro años de colaboración con los investigadores Ricardo Chirino, Leandro Fernández, Antonio López, Luis D. Boada, Domingo Navarro, Juan F. Rivero y Juan C. Díaz Chico, quienes merecen mi más profundo agradecimiento.

Estas investigaciones han sido sufragadas mediante proyectos de investigación financiados por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias, la Direccicón General de Investigación Científica y Técnica (Proyectos PA86-0474 y PM89-0218) y la Fundación Universitaria de Las Palmas de Gran Canaria

## REFERENCIAS

1. Chatterjee B, Demyan WF, Roy AK 1982 Interacting role of thyroxine and Growth Hormone in the Hepatic synthesis of $\alpha_{2u}$-globulin and its messenger RNA. J Biol Chem 258:688-692.

2. Shapiro LE 1983 Regulation of a thyroid hormone-dependent protein by growth hormone: the induction of hepatic $\alpha_{2u}$-globulin and its messenger ribonucleic acid in adult male hypothyroid rats. Endocrinology 113:1280-1286.

3. Norstedt G, Wrange I, Gustafsson J-A 1981 Multihormonal regulation of the estrogen receptor in rat liver. Endocrinology 108:1190-1196.

4. Whitlock JP 1986 The regulation of cytochrome P450 expression Ann Rev Pharmacol Toxicol 26:333-369.

5. Janeczko R, Waxman DJ, Le Blanc GA, Morville A, Adesnik M 1990 Hormonal regulation of levels of the messenger RNA encoding hepatic P450 2c (IIC11), a constitutive male-specific form of cytochrome P450. Mol Endocrinol 4:295-303.

6. Fernández L, Chirino R, Boada LD, Navarro, Cabrera N, del Rio I, and Díaz-Chico BN 1994 Stanozolol and Danazol, unlike natural androgens, interact with the Low-Affinity Glucocorticoid Binding Sites from the male rat liver microsomes. Endocrinology (en prensa).

7. Ambellan E, Swanson M, Davidson A 1981 Glucocorticoid binding to rat liver microsomal fractions in vitro. J Steroid Biochem 14:421-428.

8. Guendouz F, Blanchardie P, Denis M, Orsonneau J-L, Lustenberger P 1989

Occurrence of glucocorticoid binding sites in solubilized microsomes from rat liver. J Steroid Biochem 34:325-330.

9. Howell GM, Po C, Lefebvre Y 1989 Identification of dexamethasone binding sites on male-rat liver plasma membranes by affinity labeling. Biochem J 260:435-441.

10. Parchman LG, Cake MH, Litwack G 1978 Functionality of the liver glucocorticoid receptor during the life cycle and development of a low affinity membrane binding site. Mech Ageing Dev 7:227-240.

11. Quelle FW, Smith RV, Hrycyna CA, Kaliban TD, Crooks JA, O'Brien JN 1988 [3H]Dexamethasone binding to plasma membrane-enriched fractions from liver of nonadrenalectomized rats. Endocrinology 123:1642-1651.

12. Chirino R, López A, Navarro D, Cabrera JJ, Rivero JF, Díaz-Chico BN 1989 Steroid induction of low-affinity glucocorticoid binding sites in rat liver microsomes. J Steroid Biochem 34:97-105.

13. Chirino R, Fernández L, López A, Navarro D, Rivero JF, Díaz-Chico JC, and Díaz-Chico BN 1991 Thyroid hormones and glucocorticoids act synergistically in the regulation of the low-affinity glucocorticoid binding sites in the male rat liver. Endocrinology 129:3118-3124.

14. R. Chirino, A. López, L. Fernández, L.D. Boada, P.F. Valerón, J.C. Díaz-Chico and B.N. Díaz-Chico 1994 The role of Growth Hormone in the regulation of the Low-Affinity Glucocorticoid Binding Sites from the male rat liver microsomes Endocrinology (en prensa).

15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Al, Randall RJ 1951 Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.

16. Munson PJ, Rodbard D 1980 LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal Biochem 107:220-239.

17. Feldman D 1974 Ontogeny of rat hepatic glucocorticoid receptors. Endocrinology 95:1219-1227.

18. Smith CL, Hammond GL 1991 Ontogeny of Corticosteroid Binding Globulin biosynthesis in the rat. Endocrinology 128:83-988

19. Ballard PL 1979 Delivery and transport of glucocorticoid to target cells. In Baxter JD, Rousseau G (eds) Glucocorticoid Hormone action. Springer-Verlag, New York, p 25-48.

20. Chirino R, Fernández L, López A, Navarro D, Díaz-Chico JC and Díaz-Chico BN 1994 Age-related changes in the induction of Tyrosine Aminotransferase by Dexamethasone in the rat liver: Role of The Low-Affinity Glucocorticoid Binding Sites. Mech. Ageing and Development (enviado)

21. Roy AK 1973 Androgenic induction of $\alpha_{2u}$-globulin in rat: androgen insensivity in prepuberal animals. Endocrinology 92:957-960.

22. Frick P, Leonard JL, Goodman HM 1990 Effect of hypophysectomy on growth hormone receptor gene expression in rat tissues. Endocrinology 126:3076-3082.

23. Jansson J-O, Edén S, Isaksson O 1985 Sexual dimorphism in the control of Growth Hormone secretion. Endocr Rev 6:128-150.

24 Charlton HM, Clark RG, Robinson ICAF, Porter-Gof AE, Cox BS, Bugnon C, Bloch BS 1988 Growth hormone-defficient dwarfism in the rat: a new mutation. J Endocrinol 119:51-58.

25. Bernal J, Coleoni AH, DeGroot LJ 1978 Thyroid hormone receptors from liver nuclei: characteristics of receptor from normal, thyroidectomized, and triiodothyronine-treated rats: measurement of occupied and unoccupied receptors, and chromatin binding of receptors. Endocrinology 103:403-413.

26. Burstein PJ, Draznin B, Johnson CJ, Schalch DS 1979 The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone-dependent somatomedin, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. Endocrinology 104:1107-1111.

27. Martial JA, Baxter JD, Goodman HM, Seeburg PH 1977 Regulation of growth hormone messenger RNA by thyroid and glucocorticoid hormones. Proc Natl Acad Sci USA 74:1816-1820.

28. Martinolli MG, Pelletier G 1989 Thyroid and glucocorticoid hormone regulation of rat pituitary growth hormone messenger ribonucleic acid as revealed by in situ hybridization. Endocrinology 125:1246-1252.

29. Nunez J 1988 Mecanism of action of thyroid hormone. In BA Cooke, RJB King, HJ van der Molen (eds) Hormones and their action, part 1. Elsevier Science Publisher BV, p 61-80.

30. Mira E, Castaño JG 1989 Insulin short-term control of rat liver $\alpha_{2u}$-microglobulin gene transcription. J Biol Chem 264:18209-18212.

31. Daughaday WH, Rotwein P 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. Endocr Rev 10:68-91.

32 Mannering GJ 1971 Microsomal enzyme system which catalyze drug metabolism. In: LaDu BN, Mandel HG, Way EL (eds) Fundamentals of drug metabolism and drug disposition, chapt 12. Williams & Wilkins, Baltimore p. 206-252

33. Zaphiropoulos P, Stróm A, Robertson JA, Gustafsson J-A 1990 Structural and regulatory analysis of the male-specific cytrochrome P450 g: repression by continous growth hormone administration. Mol Endocrinol 4:53-

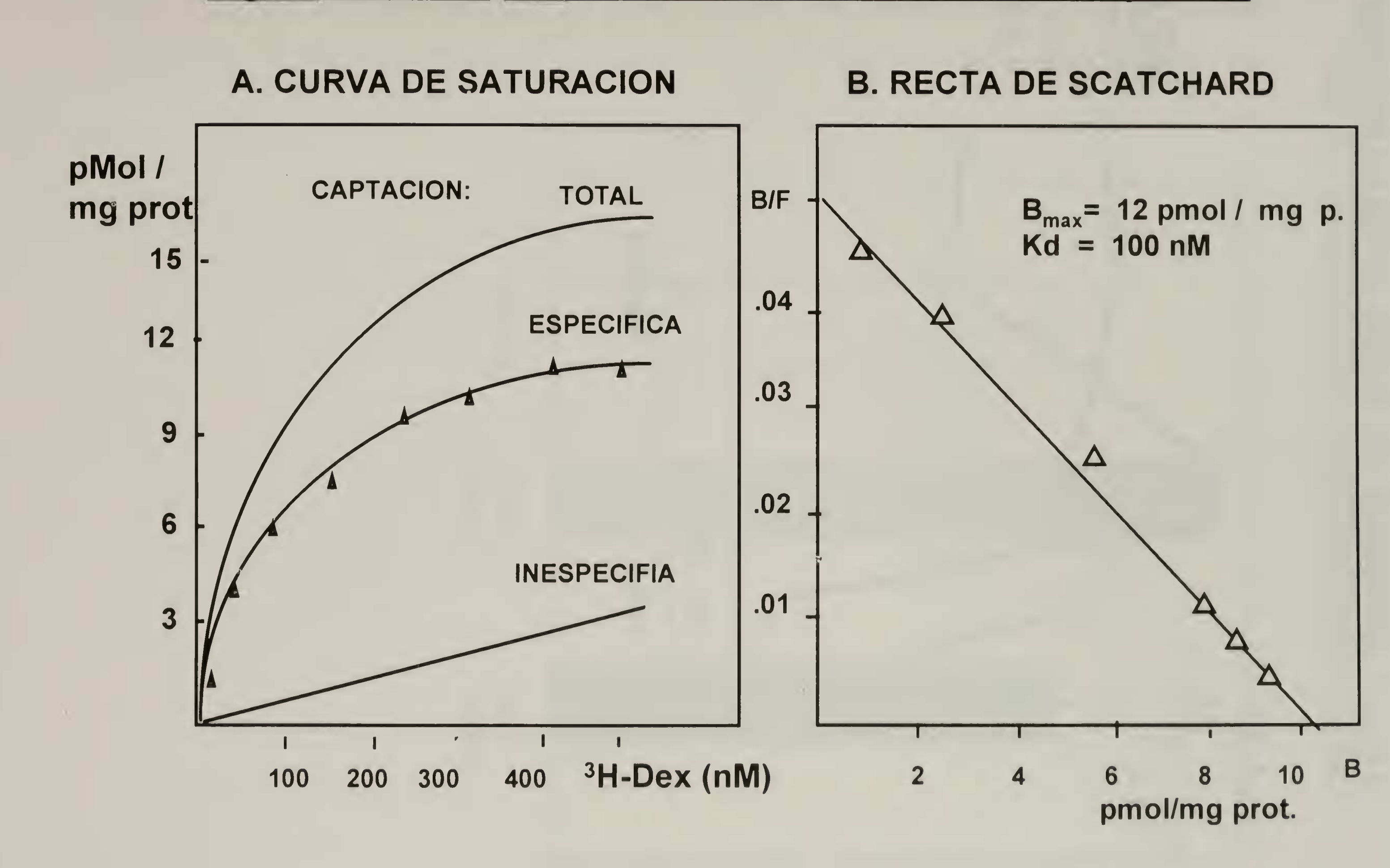
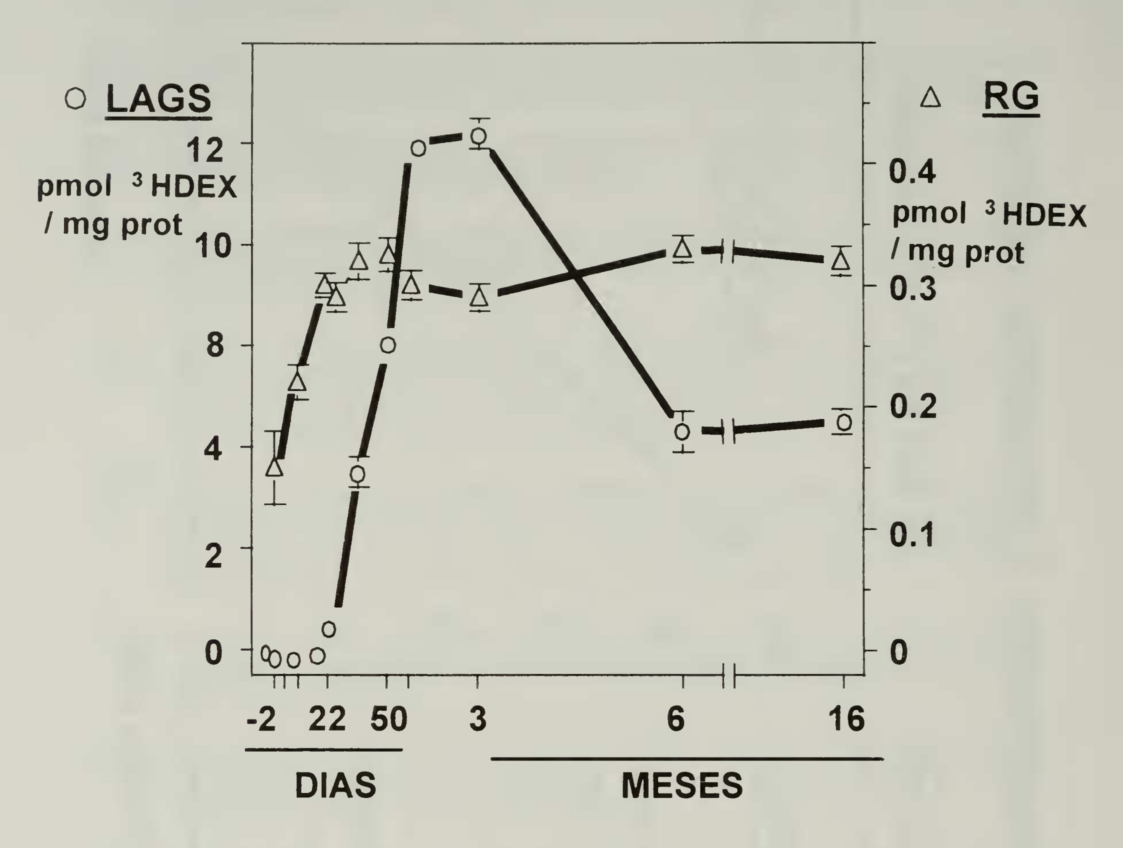
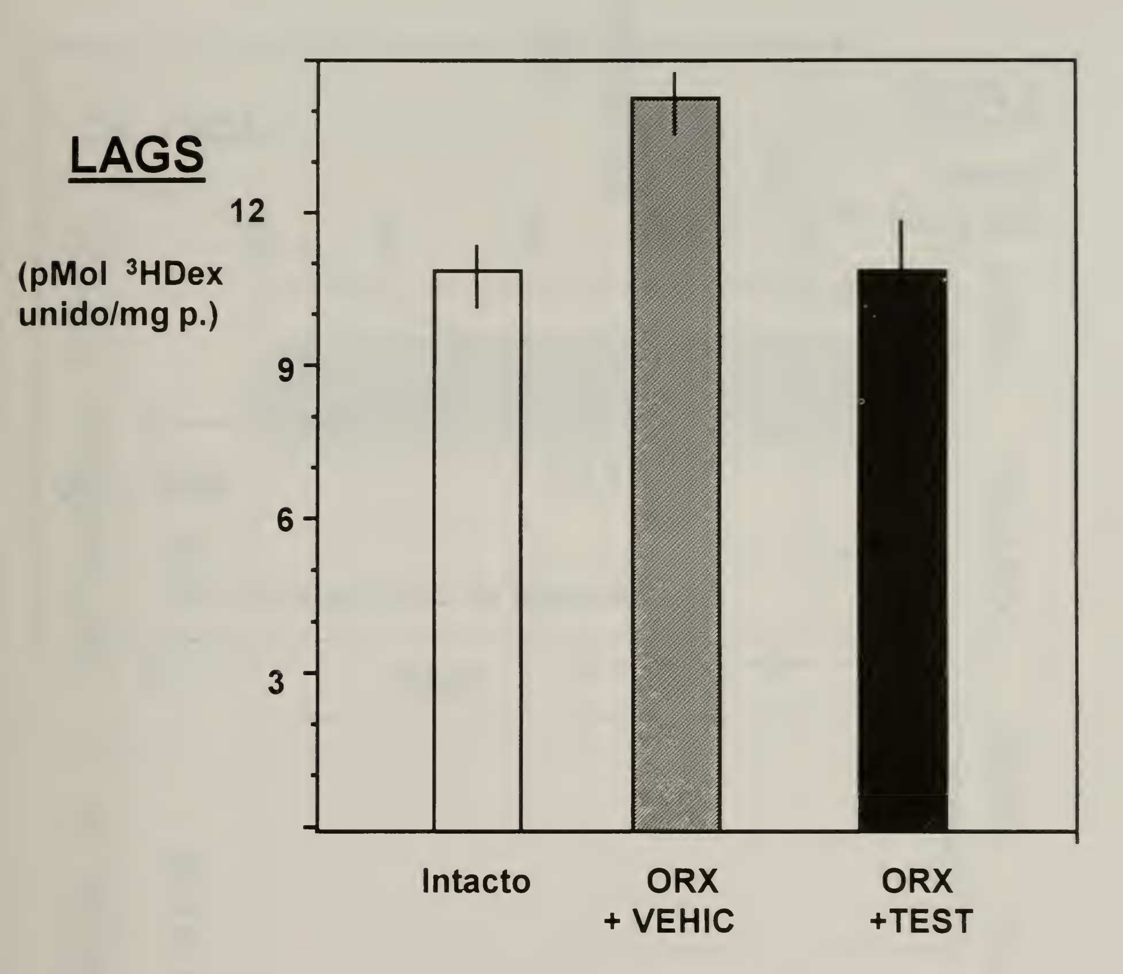



**Fig.1.- Unión de $^{3}$H-Dexametasona a microsomas hepáticos**

## Fig. 2.- Ontogenia de LAGS y RG en rata macho




Fig. 3.- Efecto de la orquidectomía (ORX)
LAGS
12
(pMol ³HDex
unido/mg p.)
9
6
3
Intacto
ORX
+ VEHIC
ORX
+TEST

## Fig. 4.- Efecto de la adrenalectomía (ADX)

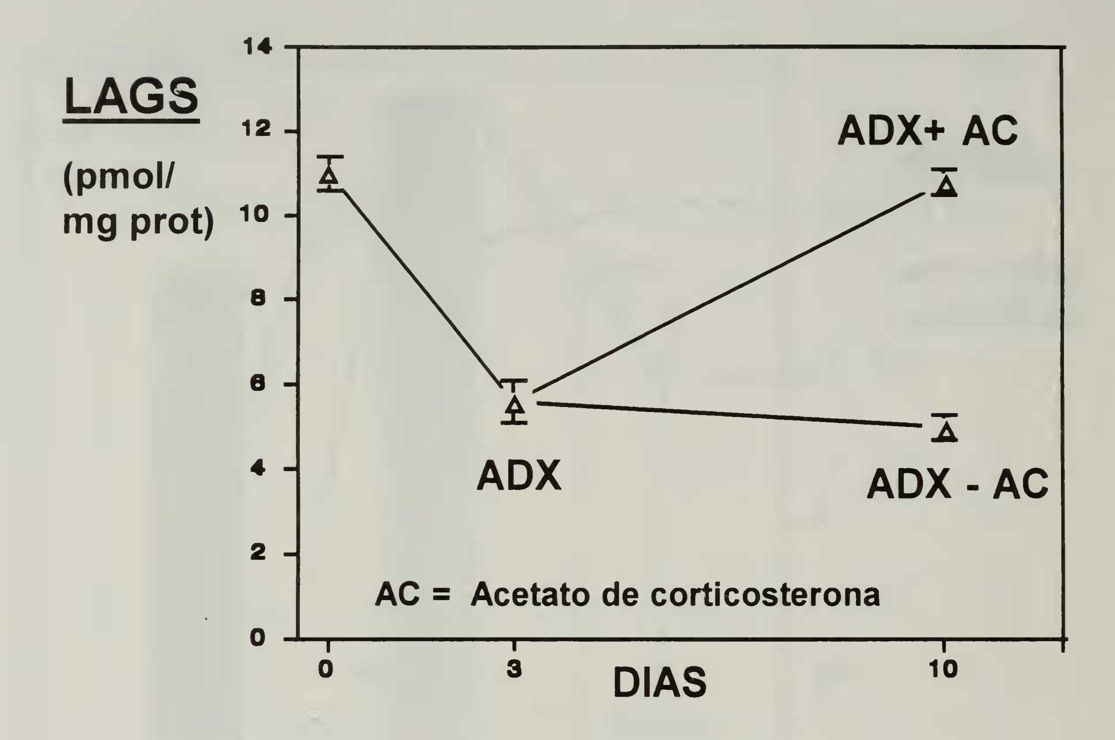
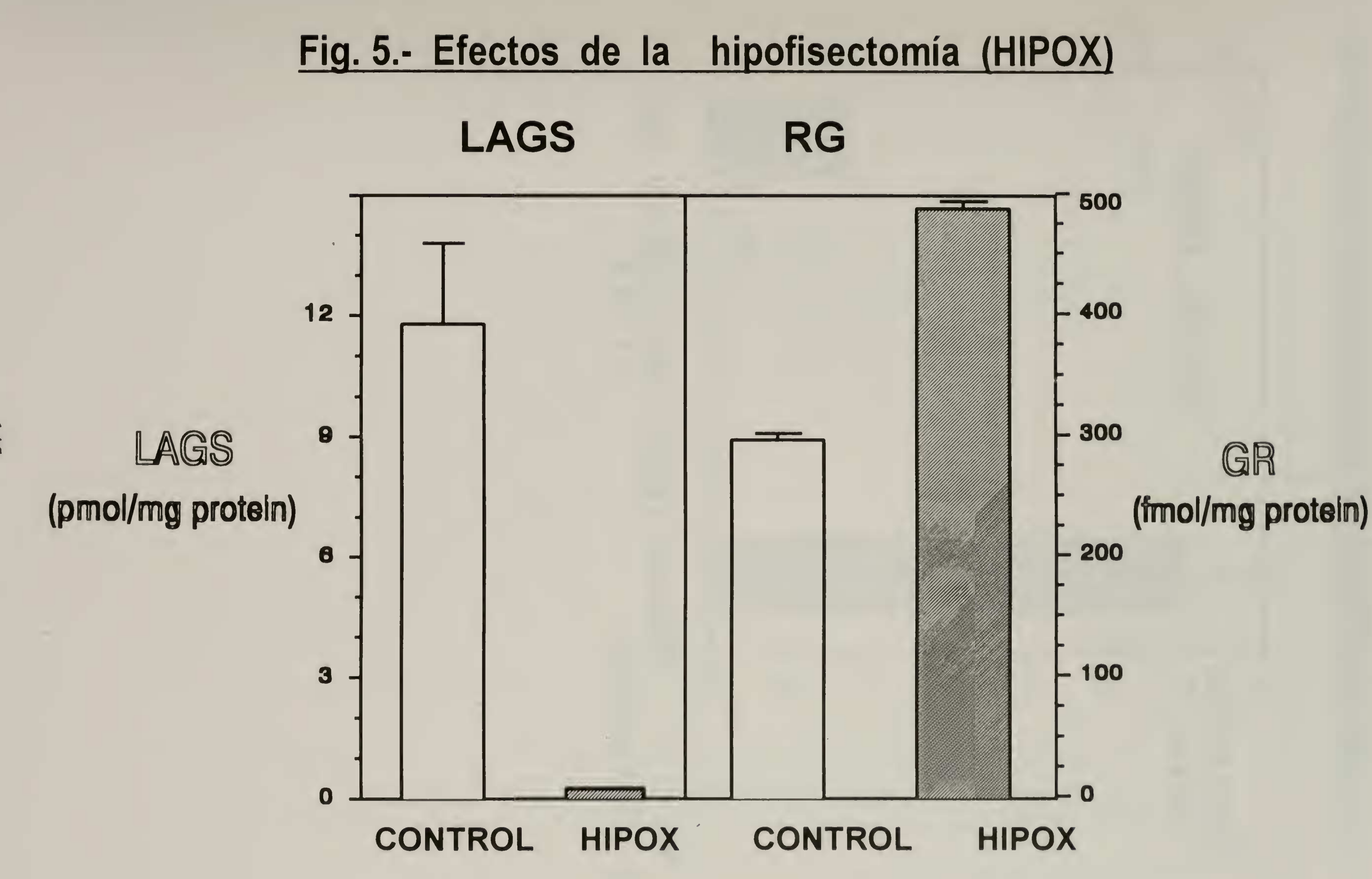
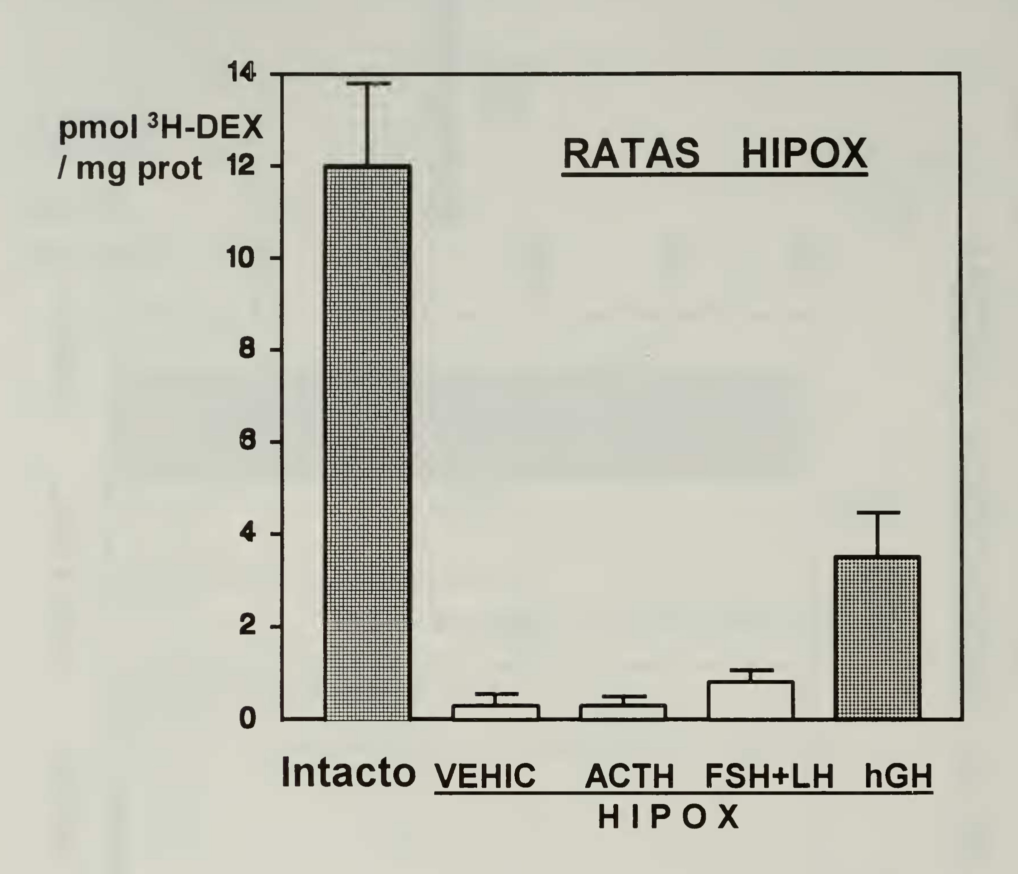


Fig. 5.- Efectos de la hipofisectomía (HIPOX)




Fig. 6.- Efecto de las hormonas hipofisarias
pmol ³H-DEX / mg prot
14
12
10
8
6
4
2
0
RATAS HIPOX
Intacto
VEHIC
ACTH
FSH+LH
hGH
HIPOX

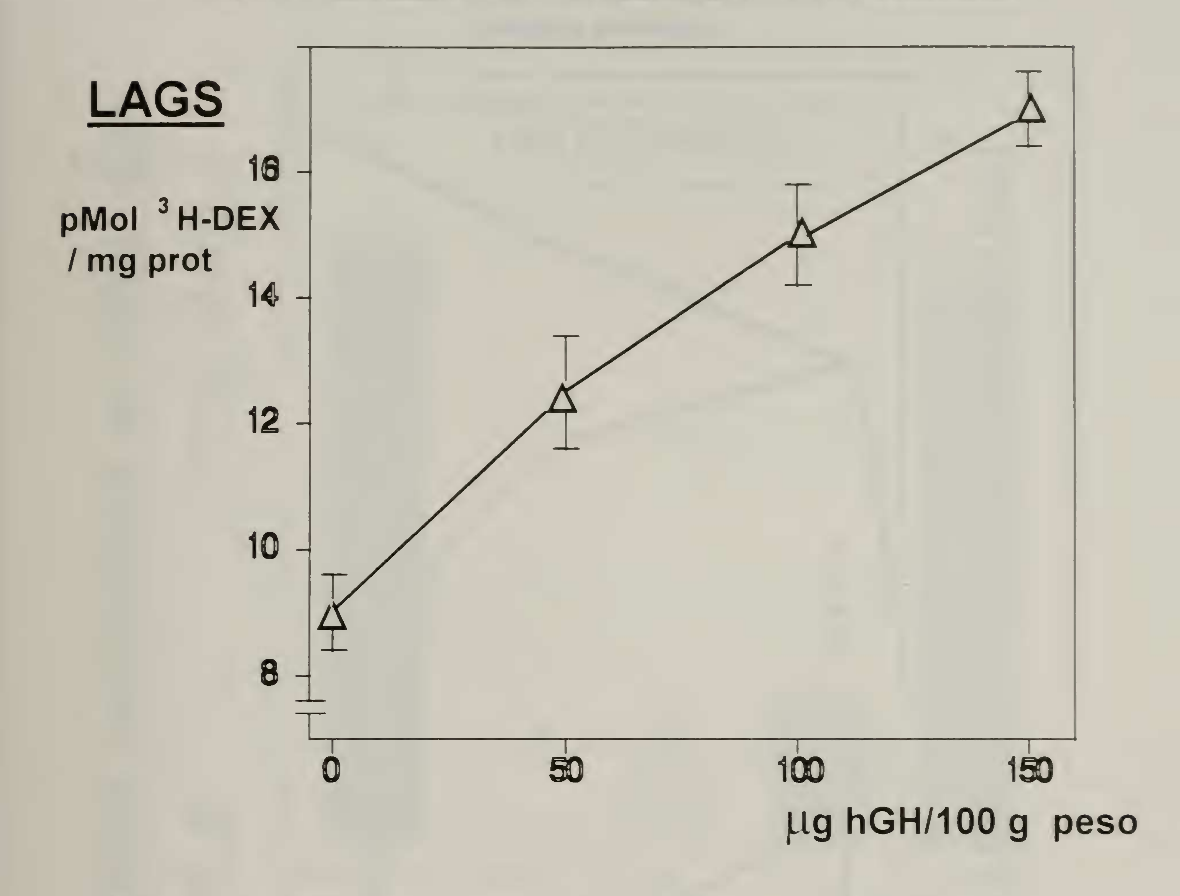
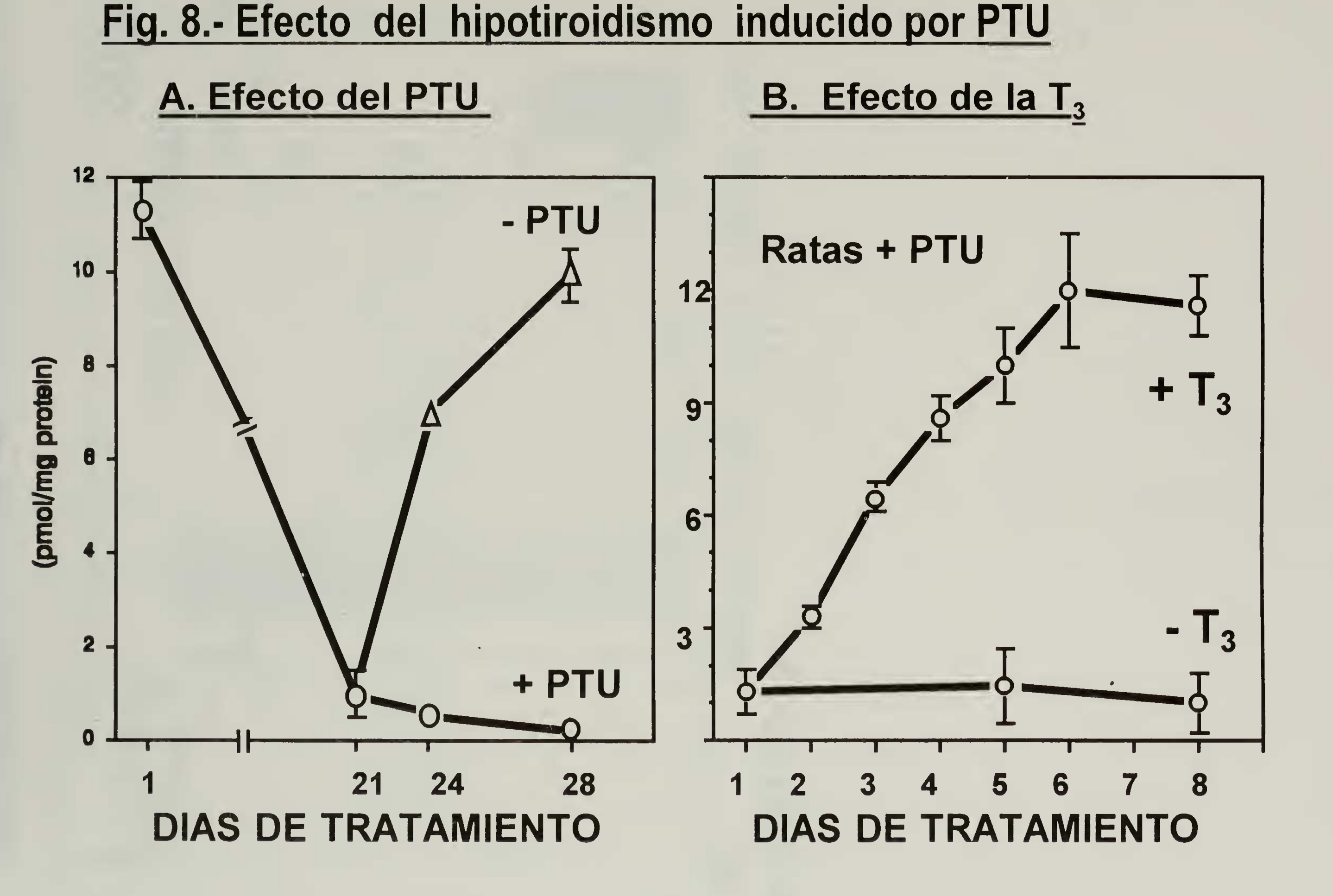

Fig. 7.- Efecto de la hGH en ratas enanas
LAGS
pMol ³H-DEX / mg prot
16
14
12
10
8
0
50
100
150
µg hGH/100 g peso

Fig. 8.- Efecto del hipotiroidismo inducido por PTU



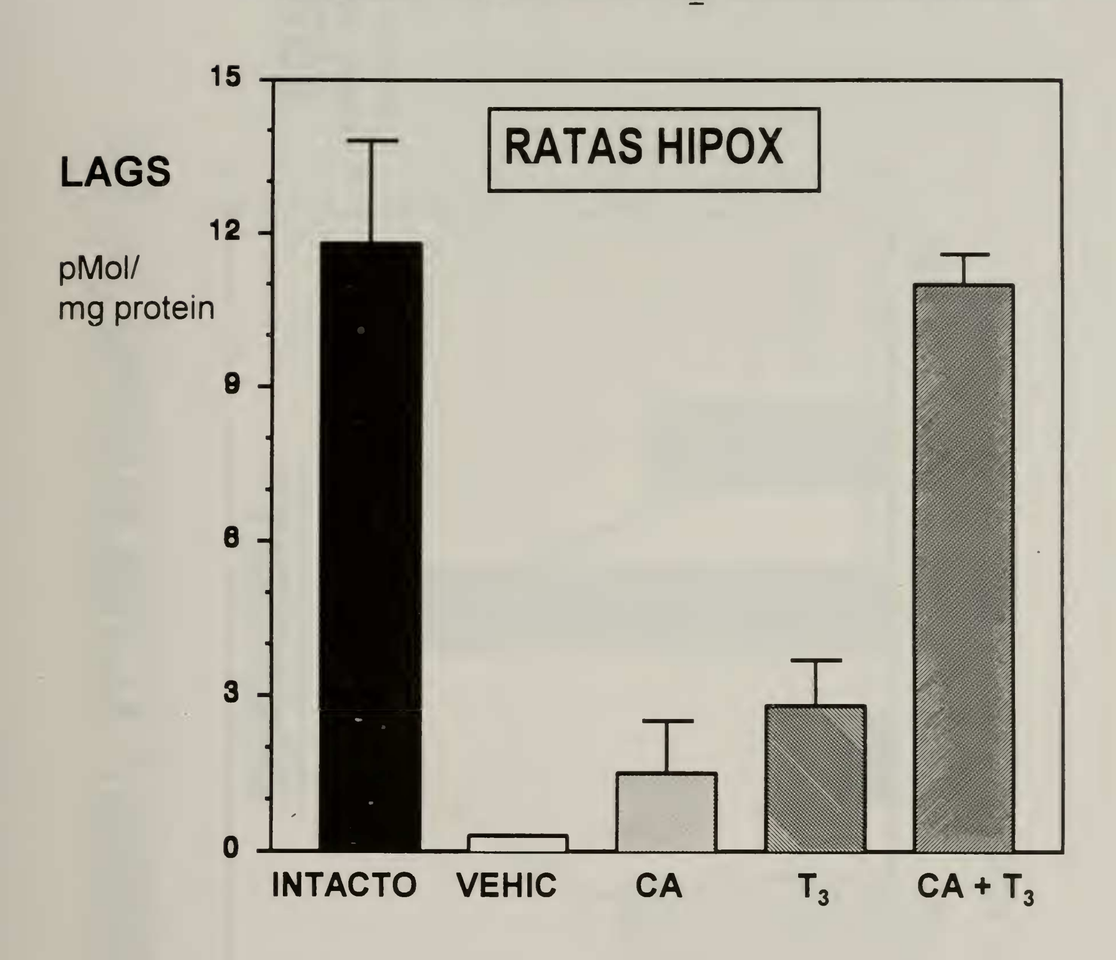

Fig. 9 .- Efectos de T3 y Corticosterona
RATAS HIPOX
LAGS
pMol/
mg protein
15
12
9
6
3
0
INTACTO
VEHIC
CA
T3
CA + T3

**Fig. 10.- Efectos de hGH, T3 y Corticosterona**

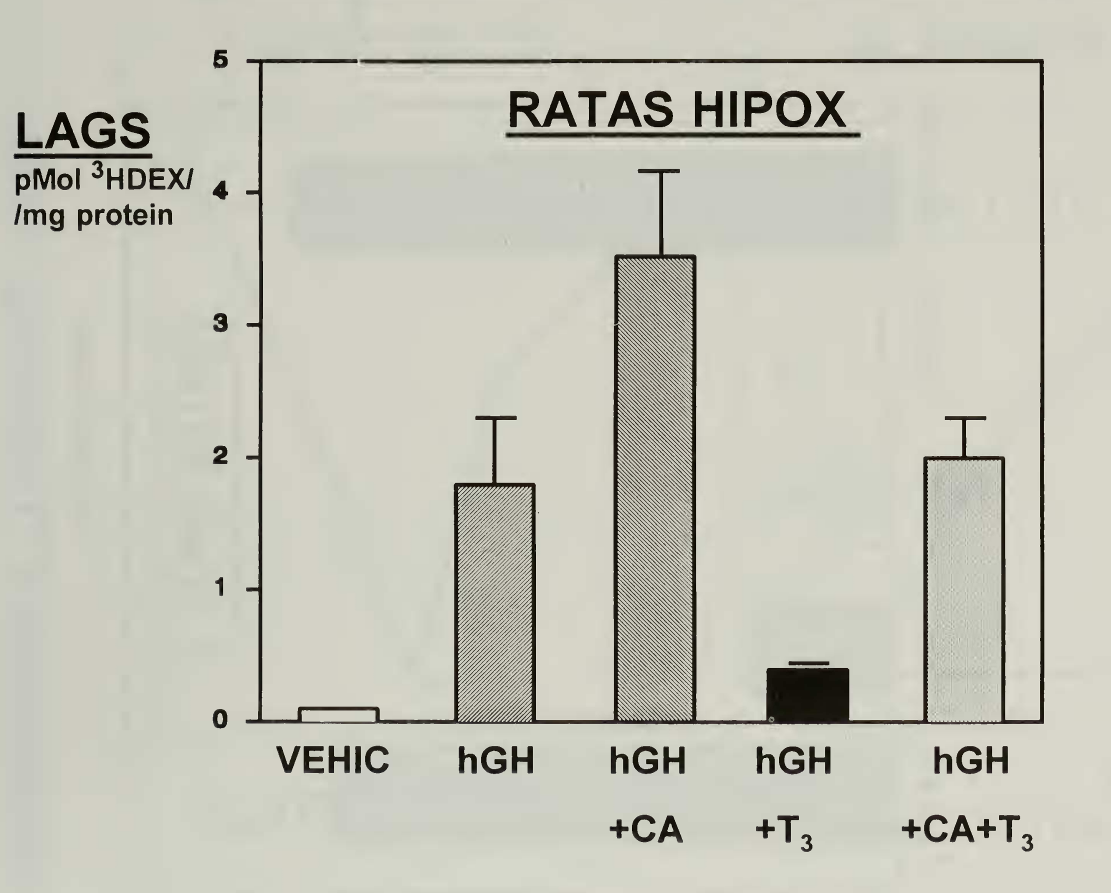
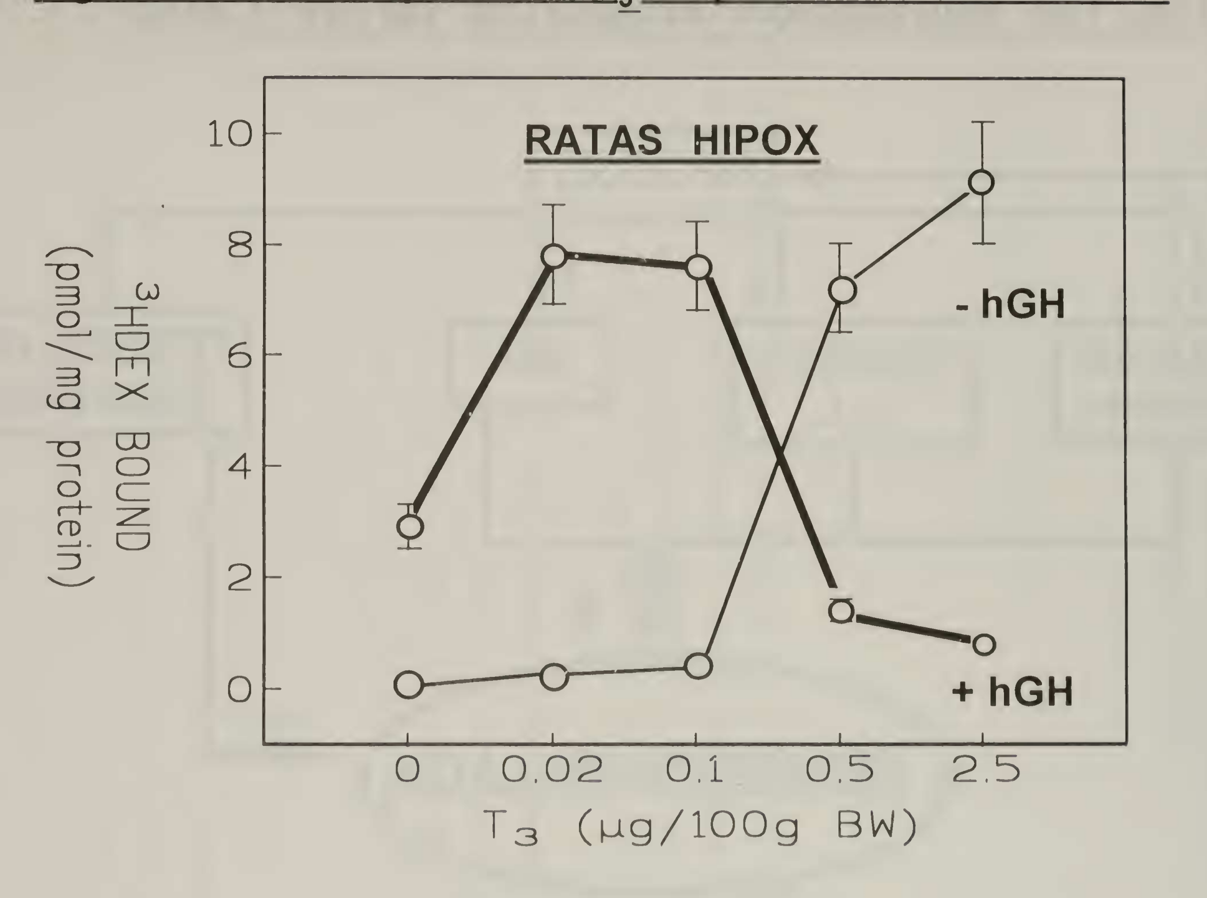


**Fig. 11.- Dosis-respuesta a $T_3$ en presencia o no de hGH**



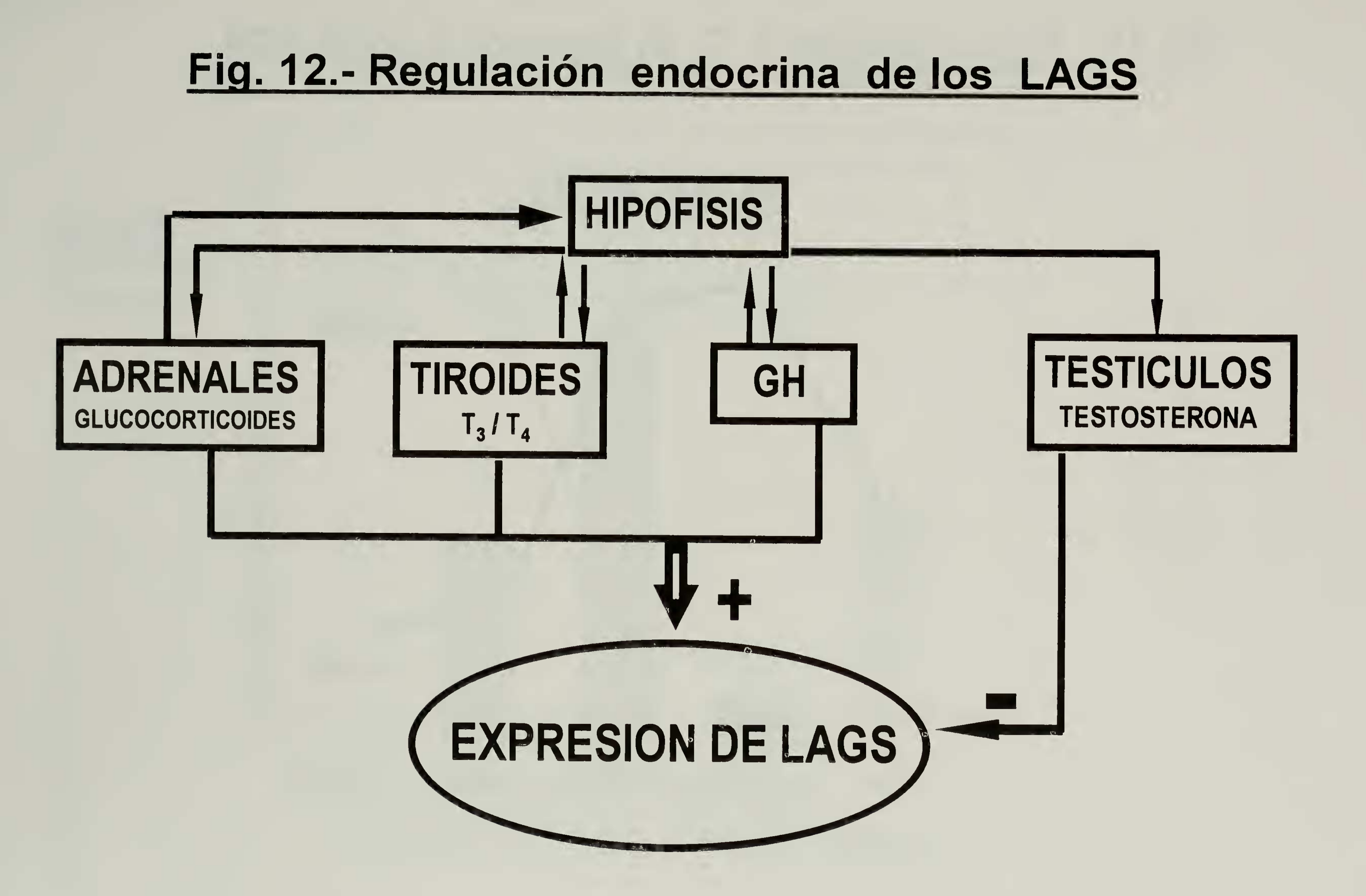



**Fig. 12.- Regulación endocrina de los LAGS**